

ALS治験勉強会
治験の仕組みから最新情報まで
2017.10.01 グランドヒル市ヶ谷 東京

ペランパネル治験・遺伝子治療
—ALSの根本治療を目指した治療戦略—

郭 伸

東京大学大学院医学系研究科
遺伝子治療研究所
東京医科大学神経内科

ALSの治療法開発戦略

ゴール1: 病気の進行を止める(遅らせる)

ALSを引き起こすメカニズム(なぜ/どのように運動ニューロンが死ぬのか)を解明することで
治療標的分子を特定し、それを正常化する



ゴール2: 失われた機能を回復する

再生医療: iPS細胞など

ALSの治療法開発戦略

そのために、

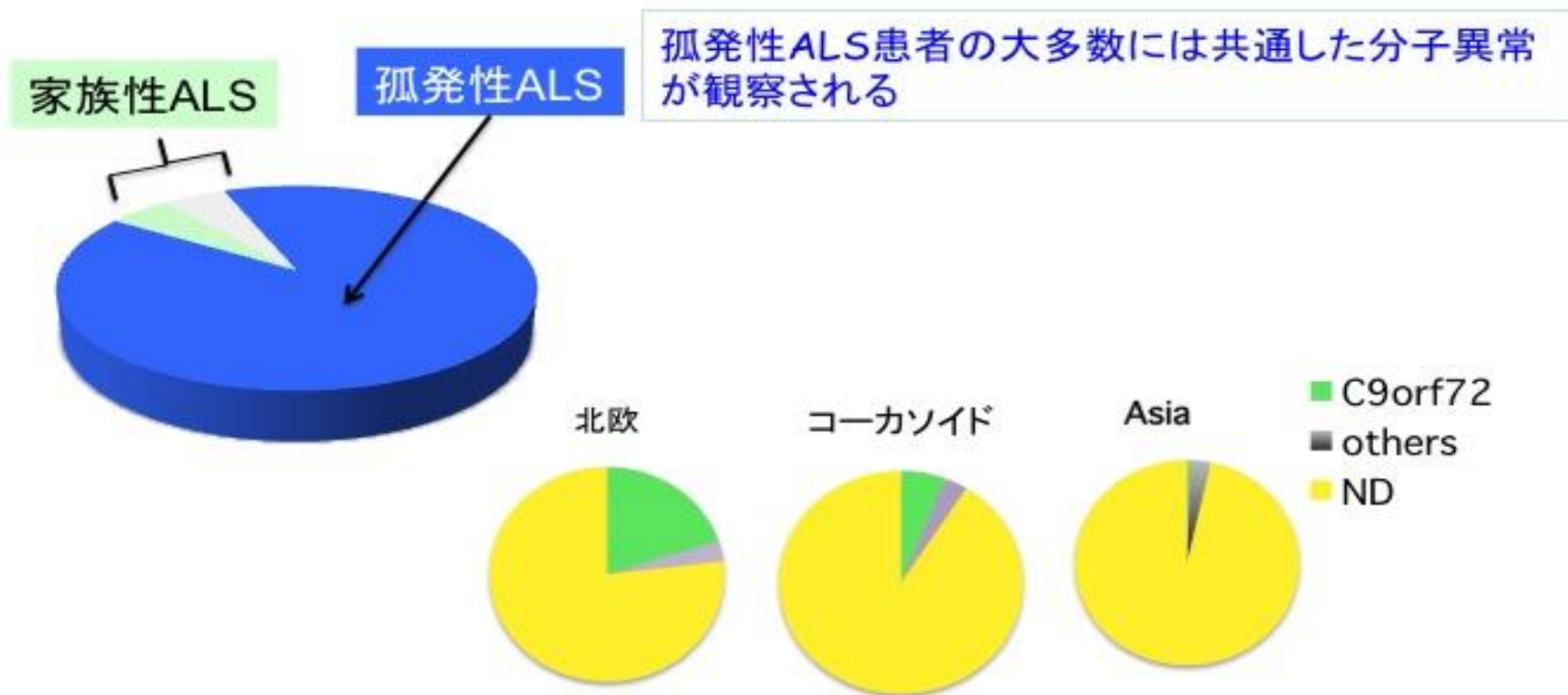
1. ALSを知る 疾患概念・病型、疫学・死因、病因：遺伝子・形態異常・分子異常
2. 病因メカニズムを解明する
 - 1) 疾患特異的な病的変化の抽出：疾患が違えば病因も異なる(筈)
 - 2) その病的変化が病因であることの検証
分子病態モデル動物の開発が必須
 - ・ 病気を再現できるか(再現性)
 - ・ 病因メカニズムは同じか(Kochの四原則)
3. 治療標的を特定して治療法の開発・証明
適切な分子病態モデル動物

治療法開発上留意すべきALSの特徴

	ALSの特徴	治療の留意点
平均発症年齢	60代前半（40歳以上が90% 働き盛り、社会的損失が大）	<ul style="list-style-type: none">治療の社会的意義が高い・成功すれば効果は大きい。決して稀な疾患ではない。治療により有病率は10倍になり得る
罹病期間	致死性疾患 平均2～4年、10年以上生存例 ～4%	
有病率	7-11/10万人 本邦で登録患者数9,000人強	
発症率	1.1～2.5/10万人/年 （60歳以上の生涯罹患危険 率：1/300とも）	
死因	呼吸筋麻痺	下位運動ニューロンの脱落が治療標的（上位運動ニューロン変性は呼吸筋麻痺を起こさない）
病因・病理	多数の疾患関連遺伝子（>50） 孤発例の病理像は驚くほど均一	<ul style="list-style-type: none">ALSの表現型は様々な原因で引き起こされる（単一疾患ではない）孤発例の病因は均一？

孤発性ALSにおけるALS関連遺伝子

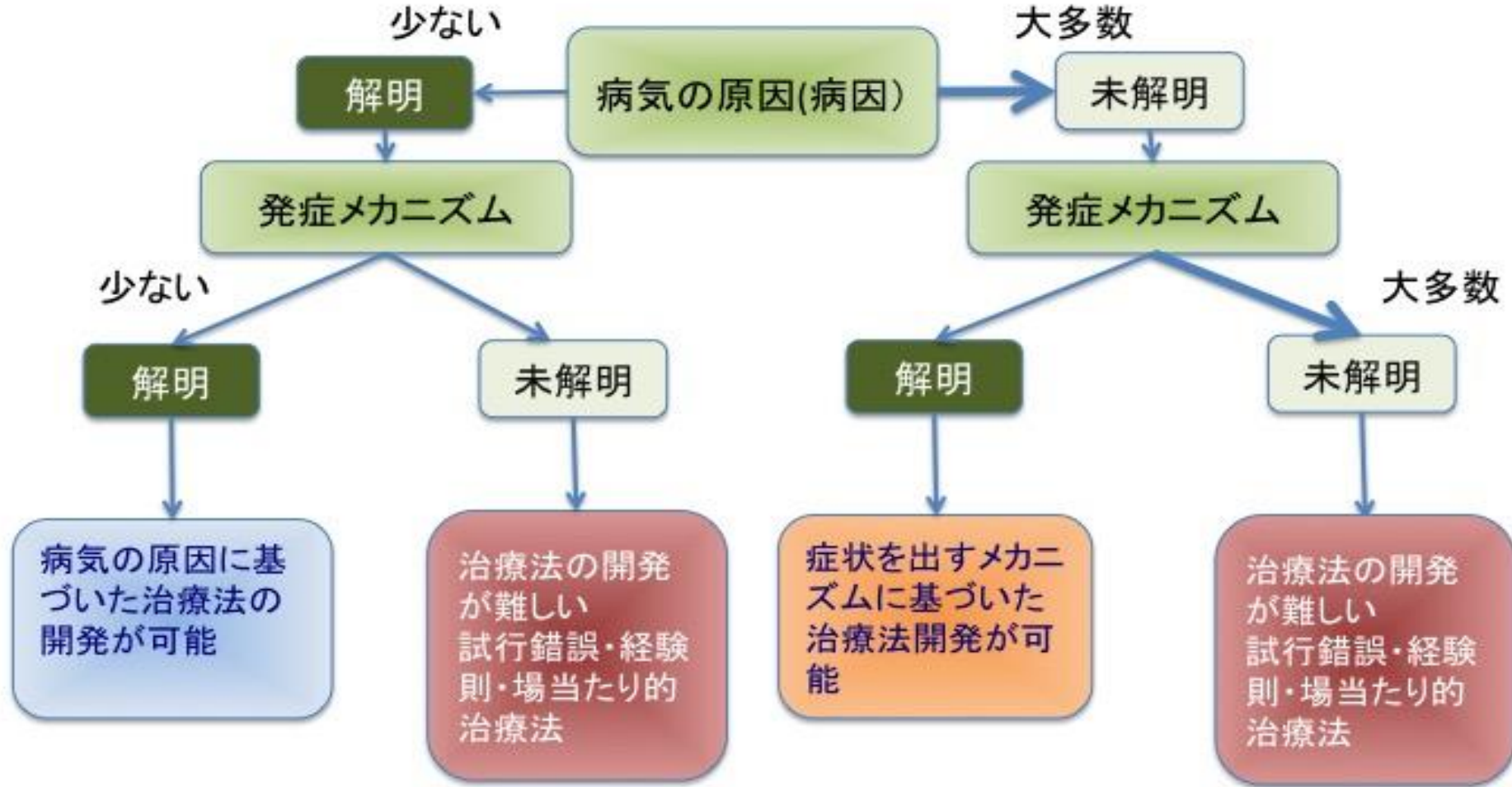
ALS: 臨床病理的疾患概念



ALSの病因

1. 多数の疾患関連遺伝子がある
 - 運動ニューロン死のパスウェイは単一ではない
 - ALSは単一疾患ではない: 病因が複数ある
2. 病型(臨床型)の多様性は病因の多様性を反映しない
 - 発症部位の違い・経過の遅速・発症年齢の違い
3. 病因が異なっても共通の病理像をとるものがある:
 - e.g. TDP-43病理(*C9ORF72*, *ATXN2*, *TARDBP*)
4. 病因の違いにより異なる病理像をとるものがある
 - e.g. *SOD1*
5. 孤発性ALSの病理像は部位にかかわらず極めて均一
 - 幾つかの異なる細胞死カスケードがあるだろう
 - 孤発性ALSの大多数では共通の細胞死カスケードをとるだろう

治療法開発



治療法がある 対症療法がある 治療法未開発

神経変性疾患の分子標的治療

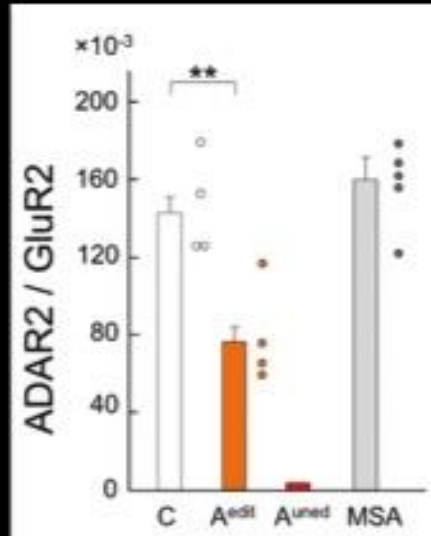
	病因分子	分子カスケード
遺伝病(メンデル型)	変異遺伝子	
	機能遺伝子(LoF)	解明可能
	機能未説明分子(GoF)	困難
孤発性疾患	遺伝子変異未説明	
	病因関連分子未説明	不明
	病因関連分子説明	解明可能
	機能分子(LoF)	解明可能
	機能未説明分子	困難

- 標的分子が特定されても、発症メカニズムがその分子の機能低下でない場合には治療法開発は難しい。
- 機能分子の異常(機能低下)を見出す必要がある

RNA編集酵素ADAR2のALS運動ニューロンにおける 特異的かつ選択的発現低下・活性低下

ADAR2 mRNA expression level

Q/R site-unedited GluA2



ALS^{edit}
ALS^{uned}
AH

RNA editing and death of motor neurons

There is a glutamate-receptor defect in patients with amyotrophic lateral sclerosis.

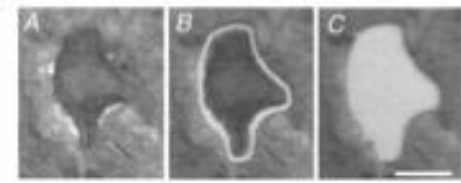
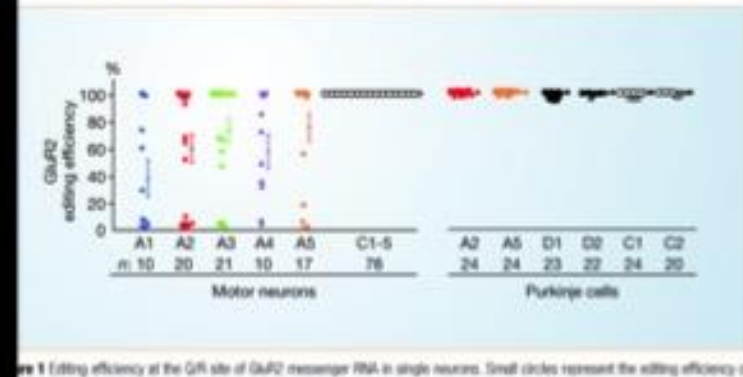


Fig 1

ADAR2-mediated A-I positions: ↓
ADAR1 mRNA, ADAR1 positions: →
ADAR3 mRNA: →

Hideyama et al (2012) *Neurobiol Dis*

Kawahara et al (2004) *Nature*

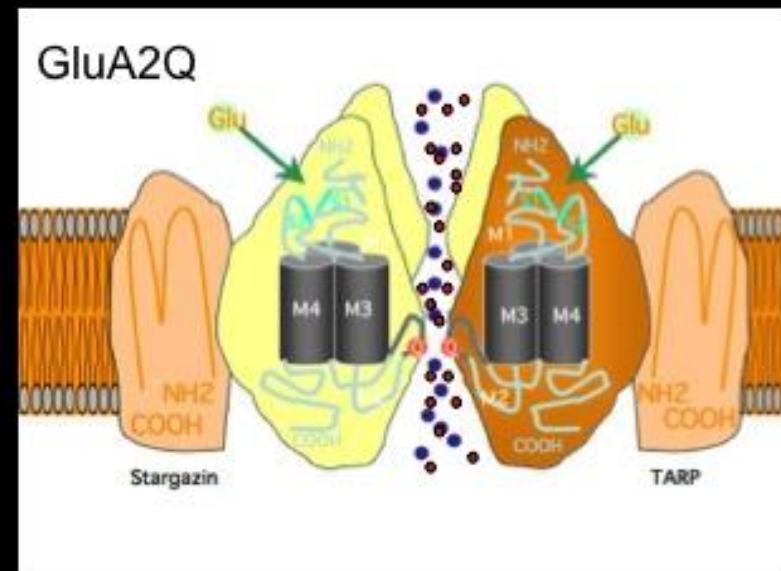
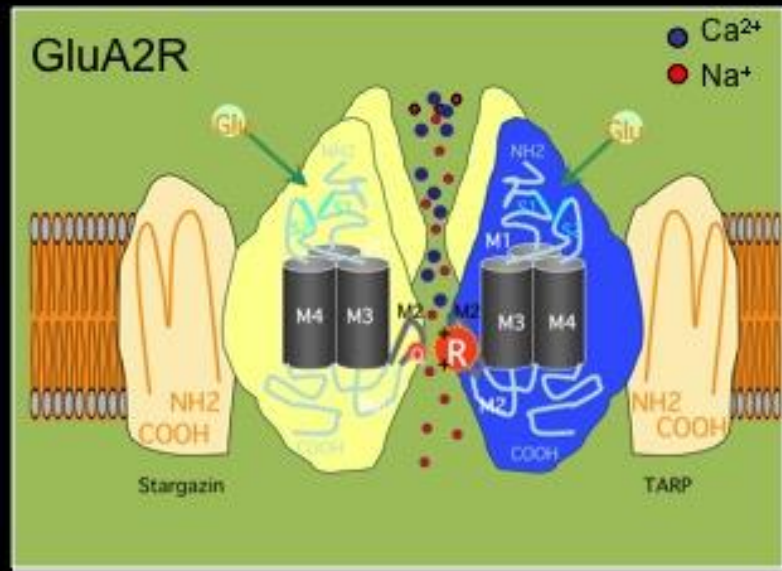
GluA2 Q/R 部位のRNA編集

AMPA receptor subunit	Genomic codon	cDNA sequence
GluA1	CAG (Gln)	CAG (Gln)
GluA2	CAG (Gln)	CGG (Arg)
GluA3	CAG (Gln)	CAG (Gln)
GluA4	CAG (Gln)	CAG (Gln)

GluA2 Q/R 部位：アミノ酸の違いによりAMPA受容体の Ca^{2+} 透過性が何故変わるのか？

Ca^{2+} 非透過性AMPA受容体
R at the Q/R site: GluA2R

Ca^{2+} 透過性AMPA受容体
Q at the Q/R site: GluA1, GluA3, GluA4, GluA2Q



■ GluA2R ■ GluA2Q ■ GluA1,3,4

ADAR family



ADAR1L p 150



ADAR1S p 110




ADAR 2 a





ADAR 2 b




ADAR3

 Z-DNA-binding

 dsRNA-binding domain RBD

 Deaminase domain

 Alu

 Arg-rich domain

ADAR2低下が運動ニューロン死の直接原因 であることの証明 分子病態モデルマウス

ADAR2欠損マウスは生後3週回以内にけいれん重責
で死亡

Higuchi et al (2000) *Nature*

→ 運動ニューロン死が起こっているかどうか不明

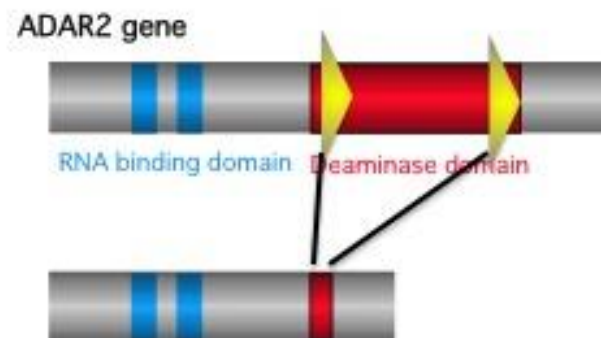
→ ADAR2を欠損すると運動ニューロンは死ぬのか？

Cre/loxP システムを使ったコンディショナル
ADAR2ノック有るとマウスを作製

Hideyama et al (2010) *J Neurosci*

- ADAR2^{flox} mouse
- VACHT/Cre mouse:

Misawa et al (2003) *Genesis*



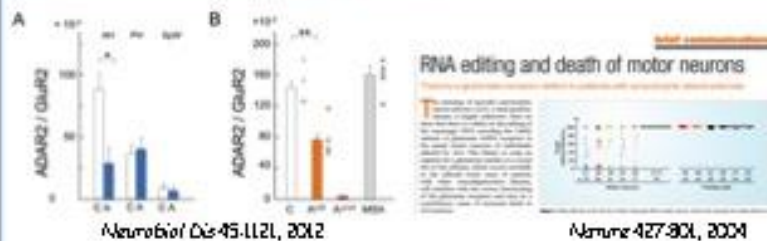
ADAR2低下の孤発性ALSにおける病因的意義

モデルマウスの相同性

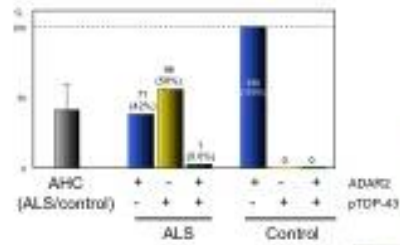
ALS患者

ADAR2発現低下

GQ/R部位未編集型GluA2

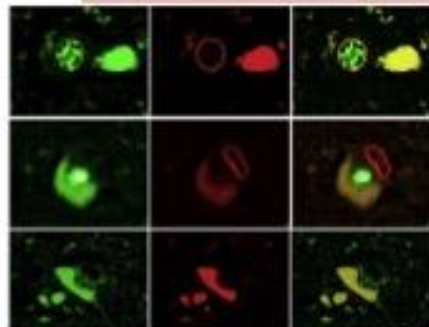


ADAR2欠損運動ニューロンのTDP-43 病理



ADAR2欠損ニューロンのNPC異常

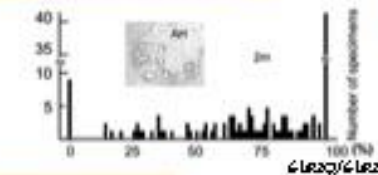
Acta Neuropathol 120:75, 2010



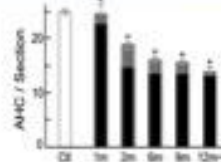
Sci Reports 7:39994, 2017

モデルマウス(AR2)

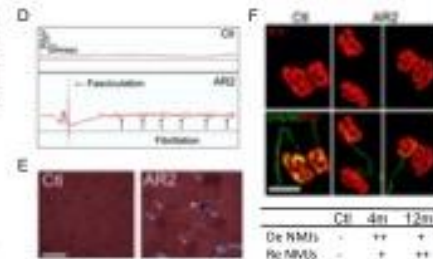
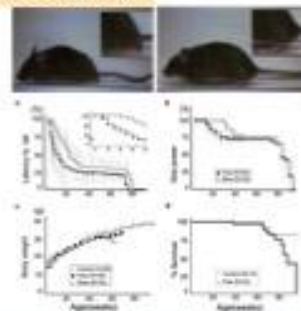
未編集型 GluA2



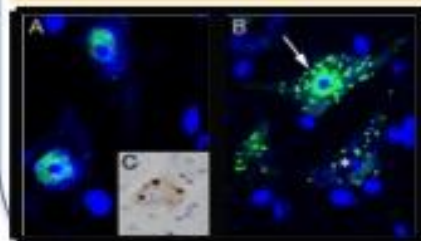
ADAR2欠損運動ニューロン脱落



ALS 症状

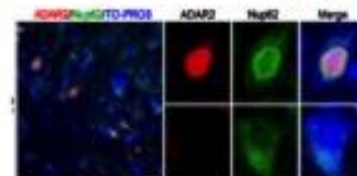


運動ニューロンのTDP-43 病理



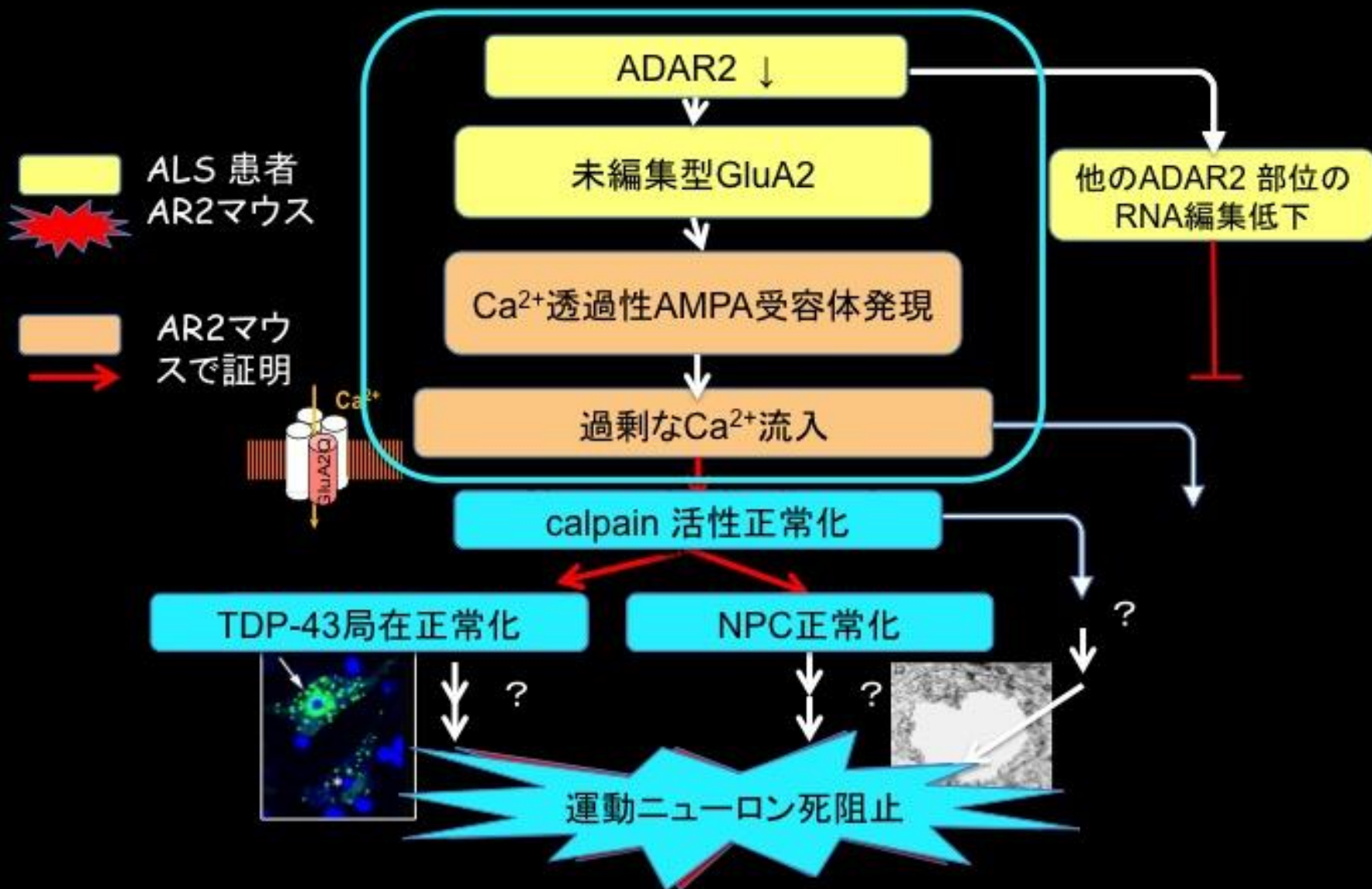
J Neurosci 30:11917, 2010; Nat Commun 3:1307, 2012

NPC 破綻

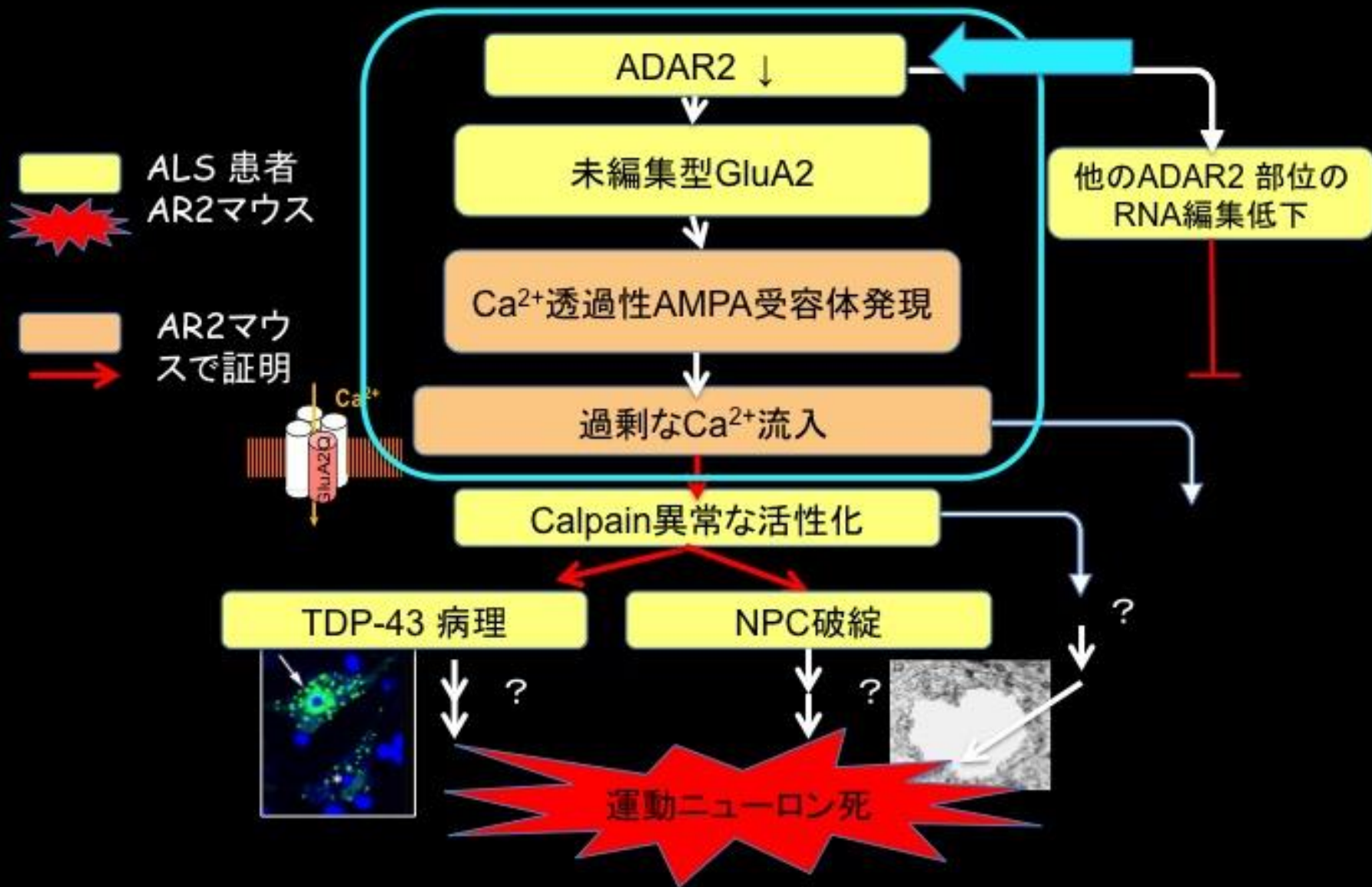


Sci Reports 7:39994, 2017

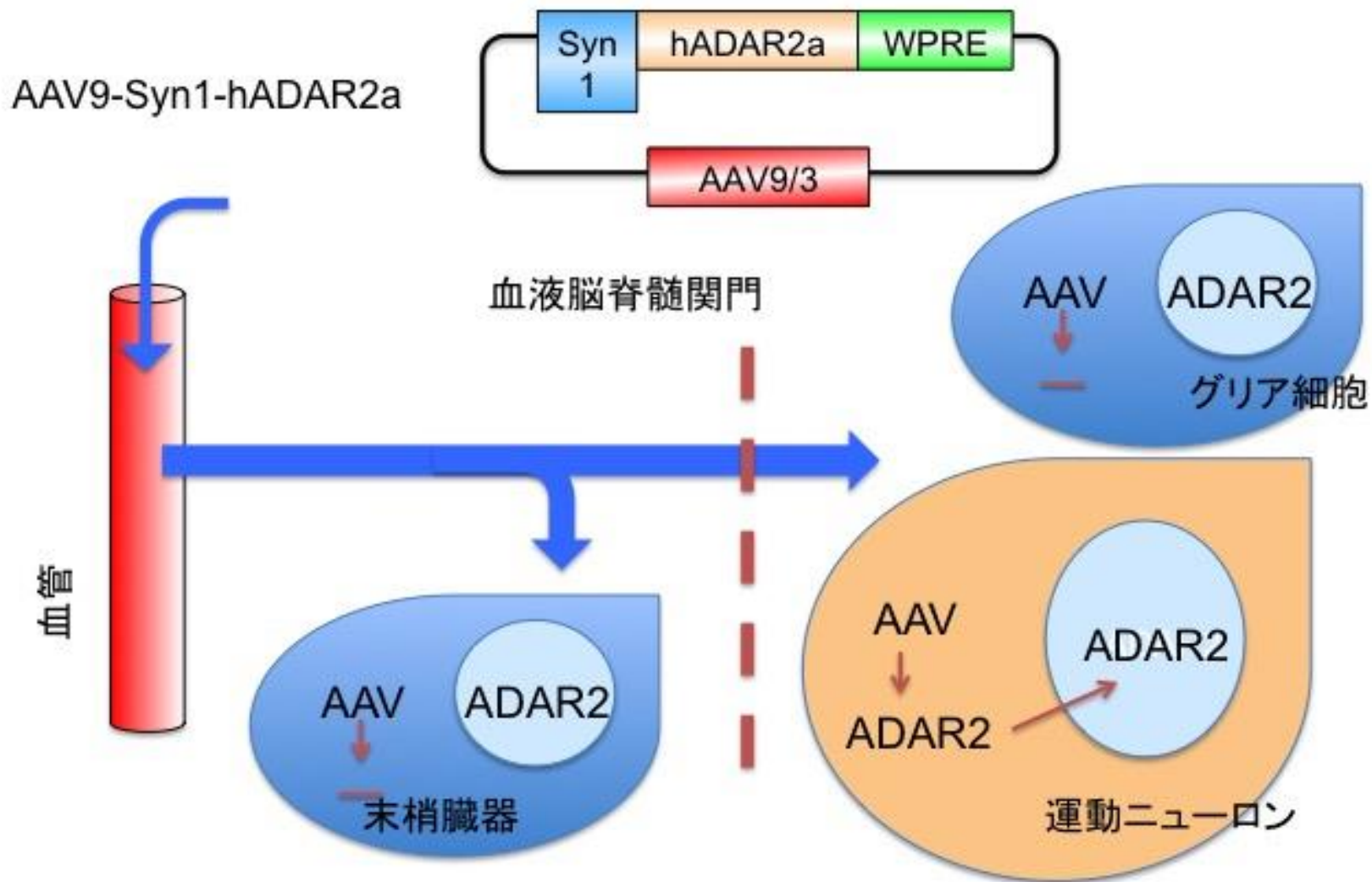
細胞死カスケードの解析から得られる治療標的



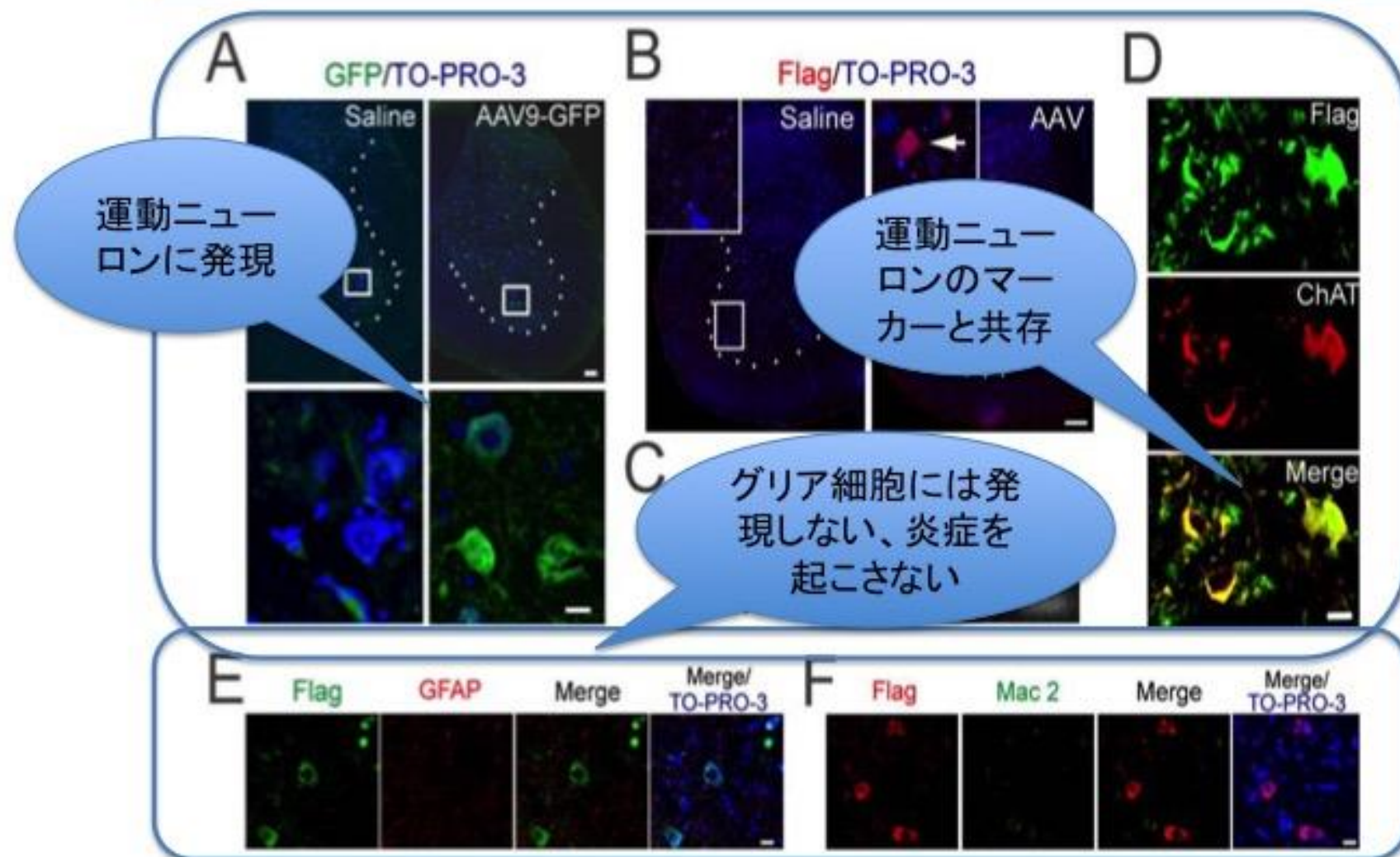
治療標的-1: ADAR2



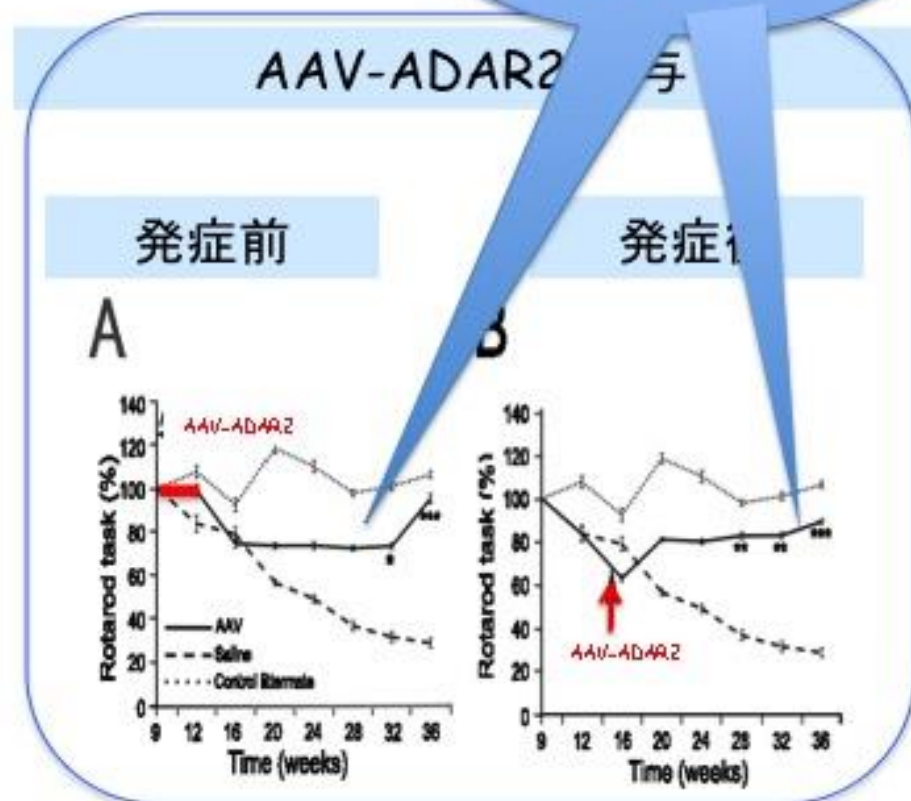
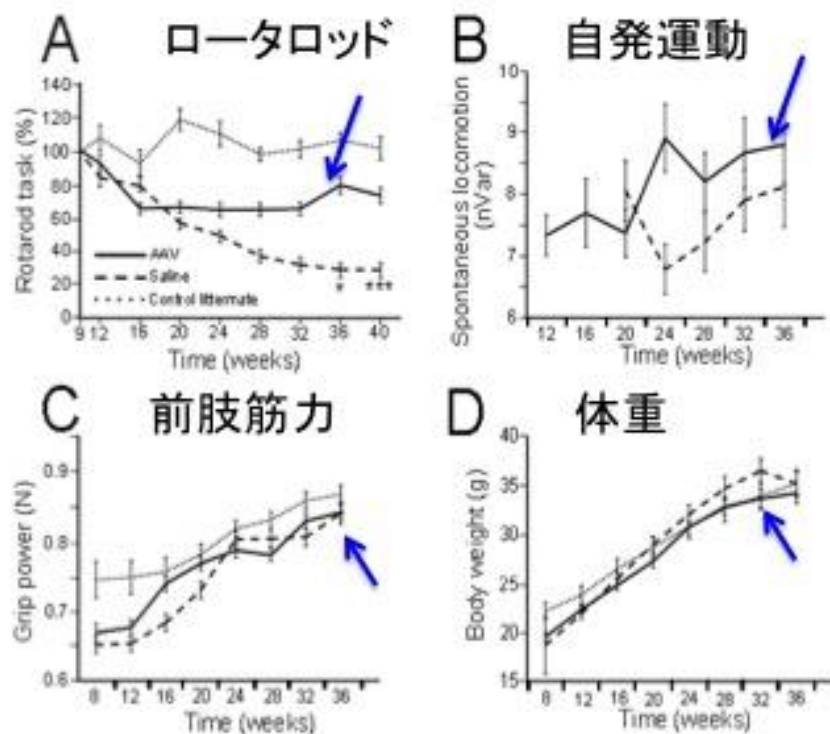
経静脈経路での運動ニューロンへのADAR2送達



マウス運動ニューロンへの 経静脈的経路でのADAR2送達

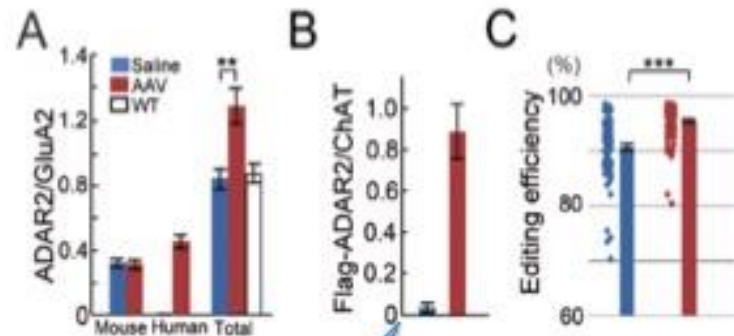


進行性運動機能低下の阻止



AAV-ADAR2による運動ニューロンでのADAR2活性の回復・細胞死阻止

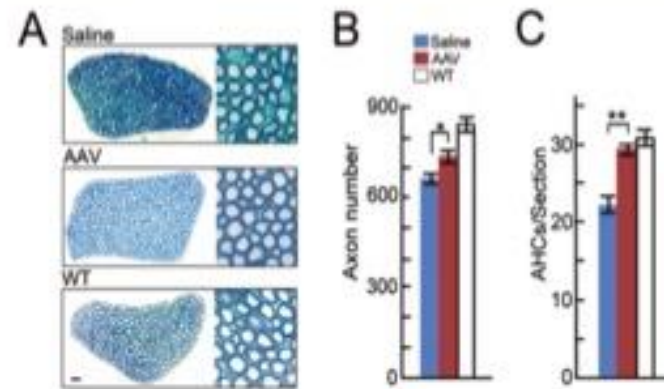
3. Rescue of ADAR2 activity in MNs



Expression level of ADAR2 mRNA is ~1.5-fold higher in the treated group than in the untreated group. **p<0.01, ***p<0.001.

ADAR2活性が回復

4. Rescue of MNs from death



Numbers of both axons in the ventral roots and AHCs are significantly higher in the treated group. There was essentially no degenerating axons that are occasionally seen in the untreated mice in the AAV group.

運動ニューロン数が回復

AAV-ADAR2による運動ニューロンでの ADAR2活性の回復・細胞死阻止

4. Rescue of MNs from death

3. F

A

ADAR2/GluA2

Expr
group

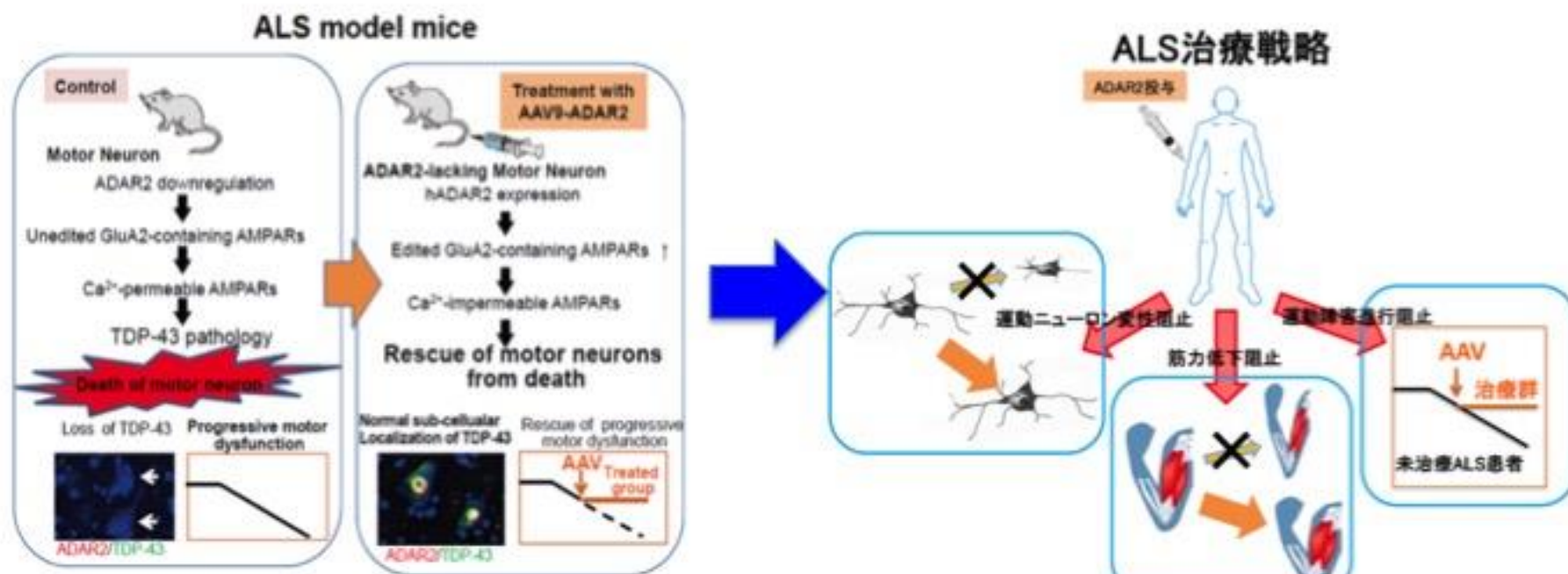
内因性ADAR2の50%程度の発現が
あれば、RNA編集活性が回復し、
治療効果が挙げられる

at

ADAR2活性
が回復

運動ニューロ
ン数が回復

分子標的治療へ向けての臨床試験



マウス体重 20-30g

ヒト体重 40-80g

1: 2,000~3,000

スケールの違いは製剤化する上で大きな障害

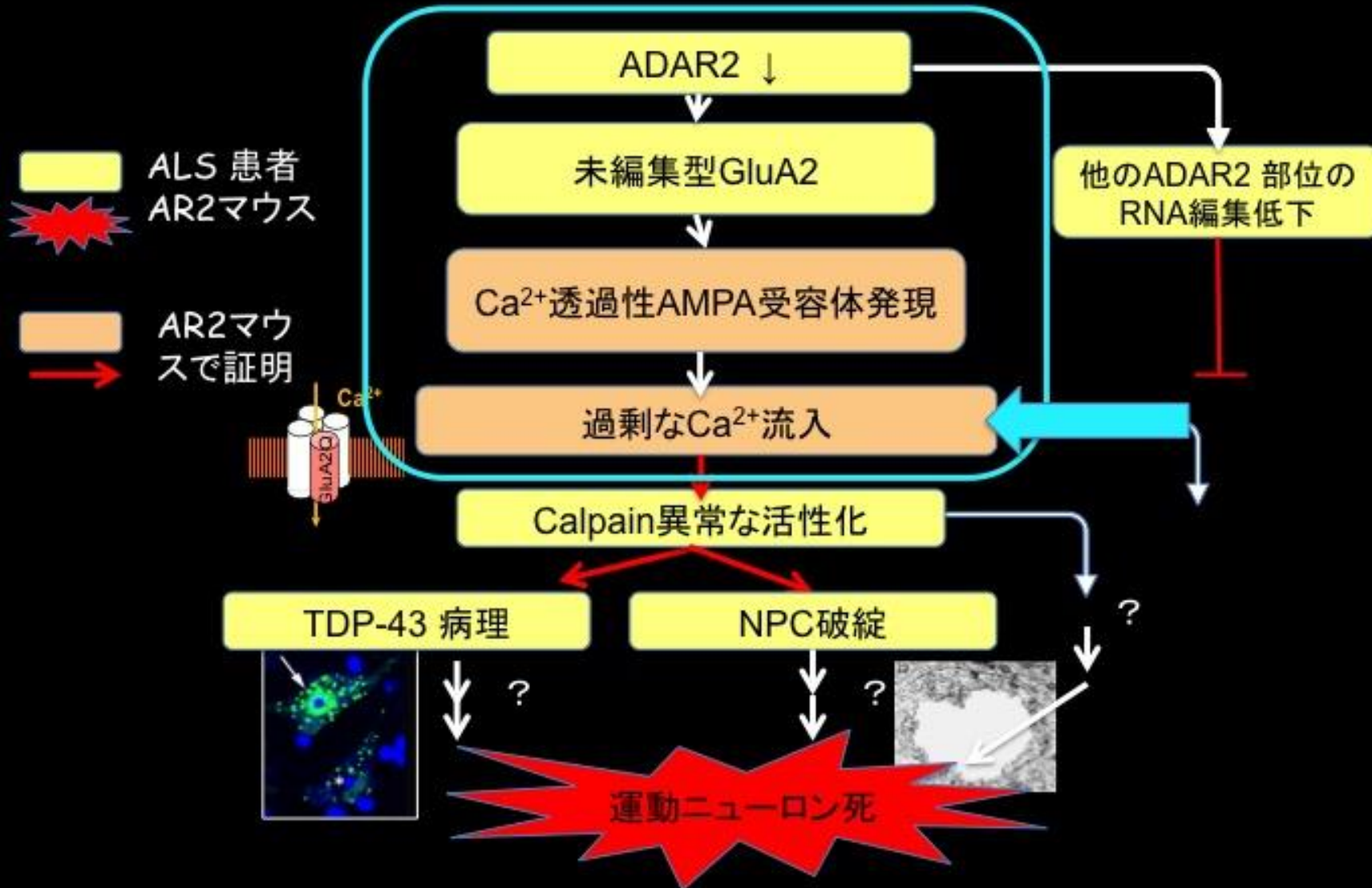
遺伝子治療臨床試験準備状況・予定



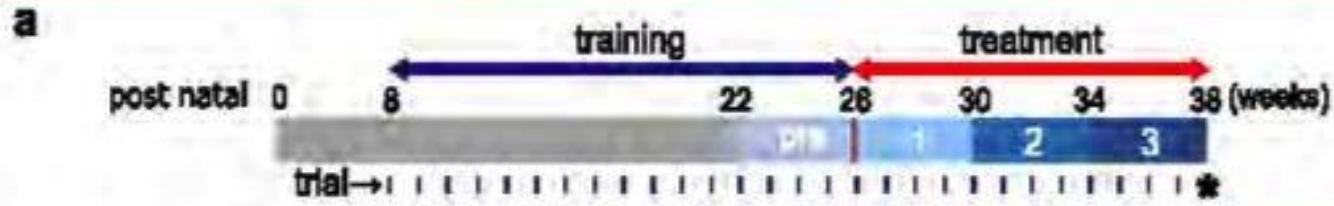
- AAV-ADAR2セルバンクシステム作成
- GMP基準での製造
 - 安全性(製造に用いるウイルス)
 - 大スケールでの製造
 - 規格・試験方法
 - 安定性
- 予備試験
- 薬効・薬理試験
- 毒性試験(免疫原性、組織傷害性)
- ウィルス動態試験
- ADAR2発現試験
- 生物由来原料基準適合性
- 製剤規格
- 非臨床試験
- 治験計画
- 実施計画書
- 治験薬概要書
- 治験届出
- 評価委員
- 治験実施
- 解析・評価

実施済み
進行中
未実施

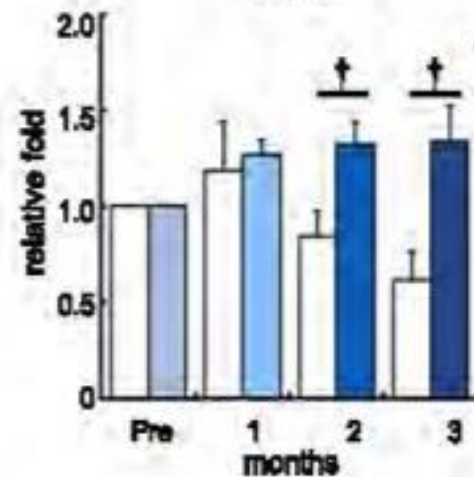
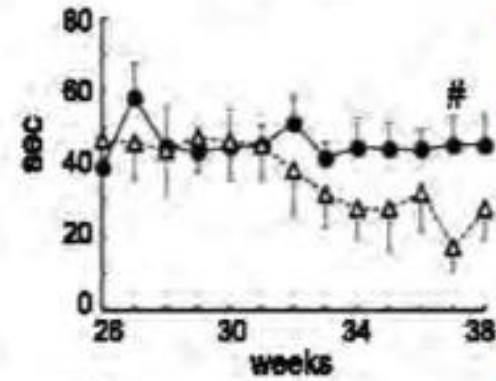
治療標的-2: AMPA受容体からのカルシウム流入



Perampanel 90日投与 (20 mg/kg/day) : 行動変化

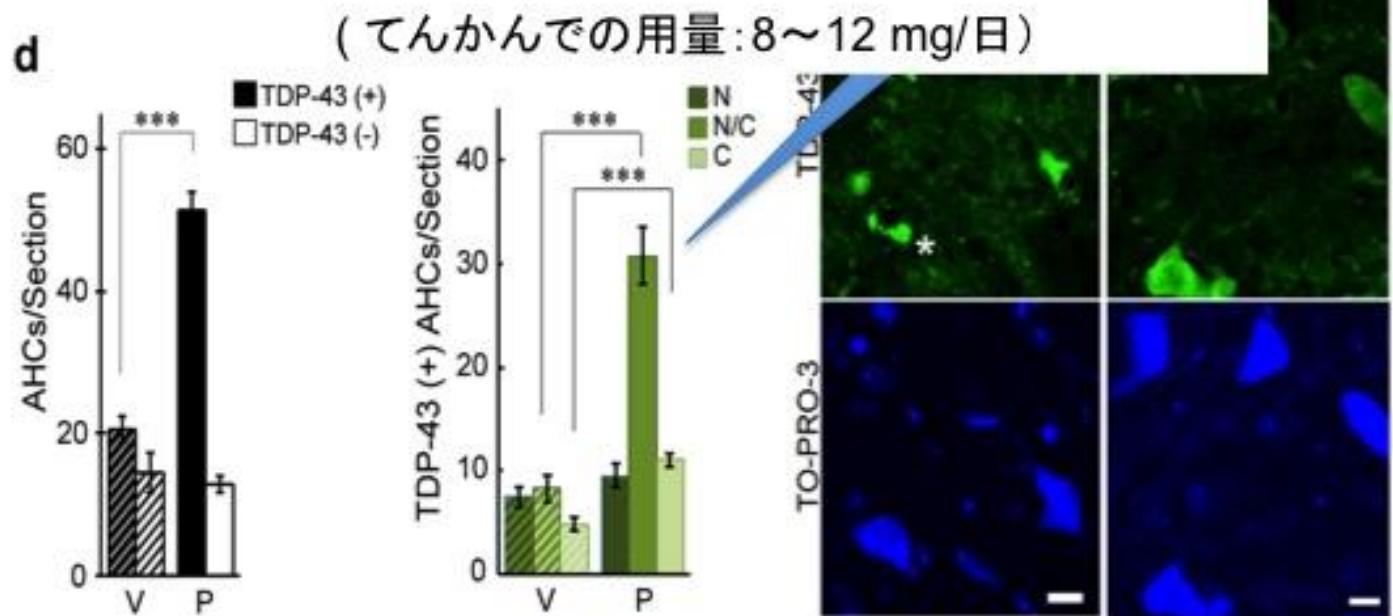
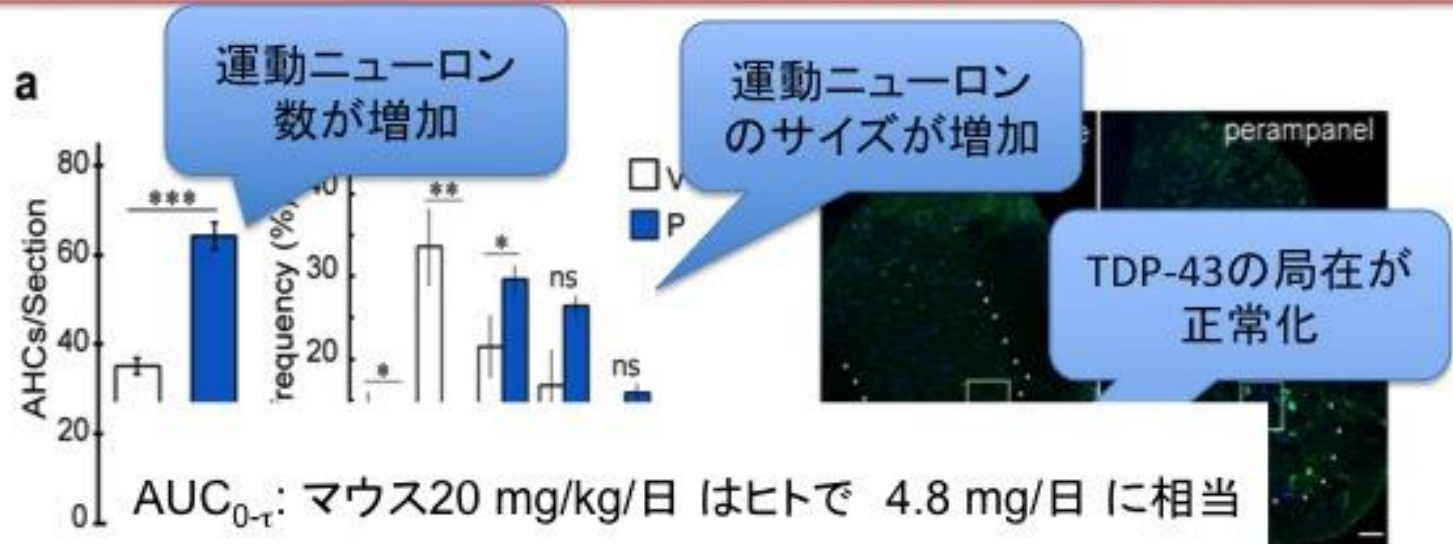


c Rotarod



2ヶ月以上の投与
で有意な運動機能
の進行抑制

Perampanel 90日投与 (20 mg/kg/day) : 形態変化



ALSの治療法開発

時間がかかる・資金がかかる

新薬の開発：\$26億/12年 (Tufts Center for the Study of Drug Development)

1. 病因解明：1860年代 JM Charcotにより疾患概念確立(150年前！)

2. 治療標的の特定 ← 10年単位、¥数百万～数千万/年

3. 治療法開発 ← 研究費調達(¥数千万～億)

4. 臨床試験 ← 資金調達(¥億～十億単位)

5. 薬事承認 ← 臨床試験終了後1-2年

